

• 临床论著 •

# ERK1/2 磷酸化异常在慢性肾衰竭继发性 甲状旁腺功能亢进发病机制中的作用

孙长丽 张建荣

**【摘要】** 目的 探讨 ERK1/2 磷酸化异常在慢性肾衰竭继发性甲状旁腺功能亢进 (SHPT) 发病机制中的作用。方法 选取在我院肾内科住院行甲状旁腺全切术的 SHPT 患者 50 例为 SHPT 组, 尸体甲状旁腺供体 8 例为对照组, 检测血磷、血钙、碱性磷酸酶、甲状旁腺激素 (PTH) 及成纤维细胞生长因子-23 (FGF-23) 水平, 免疫组化测定甲状旁腺组织中 ERK1/2、p-ERK1/2、Egr-1 的表达。结果 (1) SHPT 组患者血 FGF-23 与 PTH ( $r=0.438$ ,  $P=0.001$ )、血磷 ( $r=0.421$ ,  $P=0.002$ )、碱性磷酸酶 ( $r=0.452$ ,  $P=0.001$ ) 均呈正相关; (2) SHPT 组患者术后 3 d FGF-23 较术前相比明显降低 ( $t=8.150$ ,  $P=0.000$ ); (3) 与对照组相比, SHPT 组 ERK1/2 的表达无统计学差异 ( $F=0.101$ ,  $P=0.091$ ), p-ERK1/2 及 Egr-1 的表达显著低于对照组 ( $F=9.798$ ,  $P=0.001$ ;  $F=27.568$ ,  $P=0.000$ ), 腺瘤性增生组 p-ERK1/2 及 Egr-1 的表达显著低于弥漫性增生组 ( $t=2.812$ ,  $P=0.011$ ;  $t=2.316$ ,  $P=0.036$ ); (4) SHPT 组患者血 PTH 与甲状旁腺细胞中 ERK1/2 ( $r=-0.656$ ,  $P=0.000$ )、p-ERK1/2 ( $r=-0.696$ ,  $P=0.000$ )、Egr-1 ( $r=-0.439$ ,  $P=0.001$ ) 均呈负相关。结论 SHPT 患者甲状旁腺细胞中 ERK1/2 磷酸化的异常, 可能参与了甲状旁腺细胞增生及高 PTH 的分泌的过程, ERK1/2 信号转导通路异常在 SHPT 发病机制中可能发挥一定的作用。

**【关键词】** 细胞外信号调节 MAP 激酶类; 肾功能衰竭, 慢性; 甲状旁腺功能亢进症, 继发性; 成纤维细胞生长因子-23

**Disorder of ERK1/2 phosphorylation pathway in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism resulted from chronic renal failure** SUN Chang-li\*, ZHANG Jian-rong. \*Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

Corresponding author: ZHANG Jian-rong, Email: zhangjr0317@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of ERK1/2 phosphorylation pathway in the pathogenesis of Secondary hyperparathyroidism (SHPT) resulted from chronic renal failure. **Methods** A total of 50 SHPT patients and 8 cadaver were selected and accepted parathyroidectomy. Serum phosphorus, calcium, alkaline phosphatase, parathyroid hormone and FGF-23 were detected. The expression of ERK1/2, p-ERK1/2, Egr-1 were detected by immunohistochemistry. **Results** (1) In SHPT group, serum FGF-23 was positively correlated with PTH ( $r=0.438$ ,  $P=0.001$ ), serum phosphorus ( $r=0.421$ ,  $P=0.002$ ) and alkaline phosphates ( $r=0.452$ ,  $P=0.001$ ); (2) Compared with FGF-23 before parathyroidectomy, the FGF-23 level significantly decreased in SHPT group after parathyroidectomy ( $t=8.150$ ,  $P=0.000$ ); (3) Compared with control group, the expression of ERK1/2 in SHPT group had no difference ( $F=0.101$ ,  $P=0.091$ ). The expression of p-ERK1/2 and Egr-1 in SHPT group decreased significantly ( $F=9.798$ ,  $P=0.001$ ;  $F=27.568$ ,  $P=0.000$ ). Compared with diffusible hyperplasia group, the expression of p-ERK1/2 and Egr-1 in adenoma hyperplasia group decreased significantly ( $t=2.812$ ,  $P=0.011$ ;  $t=2.316$ ,  $P=0.036$ ); (4) In SHPT group, serum PTH was negatively correlated with the expression of ERK1/2 ( $r=-0.656$ ,  $P=0.000$ ), p-ERK1/2 ( $r=-0.696$ ,  $P=0.000$ ), Egr-1 ( $r=-0.439$ ,  $P=0.001$ ) in parathyroid cells. **Conclusion** The down-regulation of ERK1/2 phosphorylation pathway in parathyroid cells may play a role in hyperplasia of parathyroid cells and secretion of high PTH. The ERK1/2 signal pathway may be involved in the pathogenesis of SHPT.

**【Key words】** Extracellular signal-regulated MAP kinases; Kidney failure, chronic; Hyperparathyroidism, secondary; Fibroblast growth factor-23

继发性甲状旁腺功能亢进 (secondary hyperparathyroidism, SHPT) 是慢性肾衰竭 (chronic renal failure, CRF) 患者的常见并发症, 其特征是甲状旁腺增生、甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 过度合成和分泌。PTH 水平过高可导致钙磷代谢进一步紊乱, 引起血管钙化、心血管疾病、肾性骨病等严重并发症<sup>[1]</sup>。SHPT 的发病机制与多种因素有关, 高血磷、低血钙、活性维生素 D 缺乏、甲状旁腺维生素 D 受体和钙感受体表达下调、成纤维细胞生长因子-23 (fibroblast growth factor-23, FGF-23) 调节 PTH 途径异常等均可引起 SHPT 的发生。生理状态下, FGF-23 与甲状旁腺细胞膜上 Klotho-FGFR1 复合体结合后, 进入细胞内激活细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK1/2) 信号转导途径, 从而发挥抑制甲状旁腺细胞增生及 PTH 分泌的作用<sup>[2-3]</sup>。目前研究表明, FGF-23 抑制 PTH 生成的通路中多个环节出现障碍可导致甲状旁腺细胞对 FGF-23 的调节产生抵抗, 进而引起 SHPT。本文旨在探讨 ERK1/2 磷酸化途径是否参与 SHPT 的发生。

## 资料与方法

### 一、一般资料

1. 研究对象: 选取尸体甲状旁腺组织供体 8 例为对照组, 均为男性, 平均年龄 (35.20±8.11) 岁, 手术切除其正常甲状旁腺组织。选取 2009 年 1 月至 2013 年 4 月在我院肾内科行甲状旁腺全切术的 50 例 SHPT 患者为 SHPT 组, 其中男 33 例, 女 17 例, 平均年龄 (45.30±14.59) 岁。入选标准: PTH>800 pg/ml、B 超检查发现至少一个甲状旁腺增生>1.0 cm。排除标准: 有严重感染、恶性肿瘤、骨骼相关疾病及不愿参加者。

2. 试剂: ERK1/2 (cst9102)、p-ERK1/2 (cst4376)、Egr-1 (cst4153) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 二抗试剂盒为英国 Novocastra™ 的 Novolink™ 聚合物检测系统, FGF-23 试剂盒购自北京奇松生物科技有限公司。

### 二、研究方法

采用回顾性分析的方法分析研究对象的临床及病理资料, 所有患者均于术前留取空腹静脉血, 并行甲状旁腺全切术, 收集甲状旁腺组织。

1. 生化指标检测: 采集空腹静脉血 4 ml, 全自动生化分析仪检测血钙、血磷、碱性磷酸酶水平, 化学免疫发光法测定 PTH 水平。

2. 血 FGF-23 测定: 采集术前及术后 3 d 静脉血 4 ml, 抗凝后室温静置 30 min, 以 4000 r/min 15 min

离心, 收集上清, -20℃ 保存, 应用人 FGF-23 ELISA 试剂盒统一检测 FGF-23 水平。

3. HE 染色: 手术切除标本经 10% 甲醛固定, 经常规乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋制成 3 μm 切片。切片常规脱蜡至水后经苏木素染色、盐酸分化、氨水返蓝、伊红染色、二甲苯透明、封片后光镜下观察并采集照片。

4. 免疫组化: 3 μm 石蜡切片常规脱蜡至水, 置于枸橼酸缓冲液中高温修复 15~20 min, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶, 分别滴加一抗 ERK1/2 (1:100)、p-ERK1/2 (1:300)、Egr-1 (1:100), 4℃ 冰箱孵育过夜, 滴加二抗 Novolink™ 聚合物, DAB 显色, 苏木素复染, 透明, 封片, 镜下观察并采集照片。

5. 阳性细胞计数: 棕黄色颗粒状物为阳性标记, 光镜下观察阳性细胞, 每例随机选取 5 个视野 (×400 倍), 计算平均阳性细胞率。

### 三、统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用方差分析, 方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时用 Dunnett's *t* 检验。采用 Pearson 相关分析的方法分析不同因素之间的相关性, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 一、生化指标分析

1. SHPT 组 FGF-23 与 PTH 的关系: 患者术前血 FGF-23 为 (1316.80±375.15) pg/ml, 与 PTH [(2106.00±806.78) pg/ml] 呈正相关 ( $r=0.438$ ,  $P=0.001$ , 图 1A)。

2. SHPT 组 FGF-23 与钙磷代谢的关系: 患者血磷为 (2.26±0.48) mmol/L, 血钙为 (2.48±0.20) mmol/L, 碱性磷酸酶为 (573.04±333.43) IU/L, FGF-23 与血磷 ( $r=0.421$ ,  $P=0.002$ , 图 1B)、碱性磷酸酶 ( $r=0.452$ ,  $P=0.001$ , 图 1C) 呈正相关, 与血钙无相关性。

3. 手术前后 FGF-23 的变化: 患者术前 FGF-23 为 (1316.80±375.15) pg/ml, 行甲状旁腺全切术后 3 d FGF-23 为 (942.24±340.86) pg/ml, 与术前相比明显降低 ( $t=8.150$ ,  $P=0.000$ )。

### 二、病理学分析

1. HE 染色形态学分析: 正常甲状旁腺组织中主要有 3 种细胞, 分别为主细胞、嗜酸性细胞和透明细胞, 其中主细胞是主要的实质细胞 (图 2A)。SHPT 组甲状旁腺细胞胞体及细胞核均增生明显, 有些细胞核出现明显的核分裂及异型性。弥漫性增生组织以主细胞和透明细胞为主夹杂少量嗜酸性细胞, 未见明显的纤维间隔及包膜形成 (图 2B)。腺瘤性增生组织中至少

有一个边界清楚的纤维结节性间隔存在,细胞间几乎无脂肪组织(图2C)。

2. 各组甲状旁腺细胞 ERK1/2 的表达(图3,表1): ERK1/2 在对照组及 SHPT 组中的表达无统计学差异 ( $F=0.101, P=0.091$ )。

3. 各组甲状旁腺细胞 p-ERK1/2 的表达(图4,表1): 与对照组相比, SHPT 组 p-ERK1/2 的表达显著降低, 差异有统计学意义 ( $F=9.798, P=0.001$ ), 腺瘤性增生组 p-ERK1/2 的表达显著低于弥漫性增生组, 差异有统计学意义 ( $t=2.812, P=0.011$ )。

4. 各组甲状旁腺细胞 Egr-1 的表达(图5,表1): 与对照组相比, SHPT 组 Egr-1 的表达显著降低, 差异有统计学意义 ( $F=27.568, P=0.000$ ), 腺瘤性增生组 Egr-1 的表达显著低于弥漫性增生组, 差异有统计学意义 ( $t=2.316, P=0.036$ )。

5. SHPT 组患者血 PTH 与甲状旁腺组织 ERK1/2、p-ERK1/2、Egr-1 表达的关系: SHPT 组甲状旁腺细胞中 ERK1/2 的阳性细胞率为 ( $65.47 \pm 17.33$ )%, p-ERK1/2 阳性细胞率为 ( $19.15 \pm 10.14$ )%, Egr-1 阳性细胞率为 ( $18.36 \pm 9.77$ )%。血 PTH 与 ERK1/2 ( $r=-0.656, P=0.000$ , 图6A)、p-ERK1/2 ( $r=-0.696, P=0.000$ , 图6B)、Egr-1 ( $r=-0.439, P=0.001$ , 图6C)均呈负相关。

表1 各组甲状旁腺组织中相关指标表达的阳性细胞率(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	ERK1/2	p-ERK1/2	Egr-1	
对照组	69.35±3.26	31.92±5.56	33.46±5.37	
SHPT 组	弥漫性增生组	65.49±18.55	19.31±11.30 <sup>a</sup>	13.14±6.68 <sup>a</sup>
	腺瘤性增生组	64.45±16.49	8.54±5.80 <sup>ab</sup>	7.94±3.30 <sup>ab</sup>
F 值	0.101	9.798	27.568	
P 值	0.091	0.001	0.036	

注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与弥漫性增生组相比, <sup>b</sup> $P<0.05$

## 讨 论

FGF-23 是新近发现的一种重要的调磷因子, 其与慢性肾脏病的发生发展密切相关, 它不但直接调节钙-磷代谢, 而且可间接调节 PTH、维生素 D 代谢<sup>[4]</sup>。Klotho 是一种单跨膜蛋白, 主要存在于肾脏、甲状旁腺、脑垂体和脉络丛, 介导 FGF-23 的受体活性, 生理状态下, FGF-23 与靶器官中的 Klotho-FGFR1 形成的二聚体结合发挥其生物学作用<sup>[5]</sup>。ERK1/2 信号途径参与了多种细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移等过程<sup>[6-8]</sup>, 在受到多种生长因子、细胞因子和一些血管活性物质刺激后, 通过磷酸化 202 位苏氨酸和 204 位酪氨酸, 转化为其活性形式, 即 p-ERK1/2。p-ERK1/2 从细胞质进入细胞

核内, 激活多种早期转录调节基因, 如 fos、myc、jun 等, 启动和促进细胞增殖相关蛋白质基因的转录和表达, 引起细胞增殖、促进蛋白质和胶原的合成等<sup>[9-10]</sup>。Ben Dov 等<sup>[11]</sup>的研究显示, 在甲状旁腺细胞中, FGF-23 与 Klotho-FGFR1 形成的二聚体结合后, 使 ERK1/2 磷酸化为 p-ERK1/2, 后者进一步使细胞内早期生长反应因子-1 (early growth response 1, Egr-1) mRNA 水平升高, 抑制 PTH 转录, 使 PTH mRNA 水平下降, 从而抑制甲状旁腺细胞增生及 PTH 合成、分泌, 而给予 ERK1/2 磷酸化途径抑制剂 U0126 后, 可观察到 PTH 水平显著上升, 由此可看出, ERK1/2 磷酸化途径在 FGF-23 对 PTH 的调节中发挥重要的作用。

2012 年 Roman-Garcia 等<sup>[12]</sup>对高磷饮食诱导的不同严重程度 SHPT 的大鼠进行研究, 分别测定中度、中重度及重度 SHPT 大鼠血 FGF-23 及 PTH 水平, 结果表明: SHPT 越严重, 血 FGF-23 及 PTH 水平越高; 同时对甲状旁腺组织中 ERK1/2、p-ERK1/2 表达水平进行测定, 结果显示, 随着 SHPT 严重程度不断增加, p-ERK1/2 表达水平随之下降, ERK1/2 表达水平则无差异。本研究也得到类似的结果: 与对照组相比, SHPT 组甲状旁腺组织中 ERK1/2 表达水平无差异, 而 p-ERK1/2 及 Egr-1 表达水平显著低于对照组, 且 PTH 与增生甲状旁腺细胞中 ERK1/2、p-ERK1/2、Egr-1 的表达呈负相关, 表明 SHPT 患者的甲状旁腺组织中 ERK1/2 的磷酸化过程发生障碍, 导致 p-ERK1/2 的生成减少, Egr-1 不能被激活; 由于 FGF-23 抑制 PTH 生成的通路被阻断, 故引起 PTH mRNA 水平升高, 甲状旁腺细胞增生 PTH 过度分泌, 导致 SHPT 发生。同时, 与弥漫性增生组织相比, 腺瘤性增生组织中 p-ERK1/2 及 Egr-1 表达水平降低更明显, 说明 ERK1/2 磷酸化的异常还可能与 SHPT 疾病的严重程度有关, 这对临床进一步认识该类疾病及提出针对性治疗方案具有一定的指导意义。

本研究还发现, SHPT 患者血 FGF-23 水平与血磷水平呈正相关, 与 Sliem 等<sup>[13]</sup>学者的研究结果一致。对此可能的解释是, 一是随着肾小球滤过率的下降, 尿磷排泄的方式不足以排出超负荷的血磷水平继而刺激 FGF-23 分泌增加; 同时, 在 CKD 时, FGF-23 的代谢或清除减少也可导致其水平升高<sup>[14]</sup>; 更重要的原因则是 CKD 时 FGF-23 调节血磷代谢的靶器官——肾脏及甲状旁腺对 FGF-23 的调节产生抵抗, 这可能与这些靶器官组织中 Klotho 蛋白的表达减少有关。尽管目前尚无研究证实 CKD 患者 FGF-23 生成增加, 但有研究发现, FGF-23 水平会随着血肌酐及尿素水平的升高而升高, 且行肾移植术的患者血 FGF-23 水平会迅速下

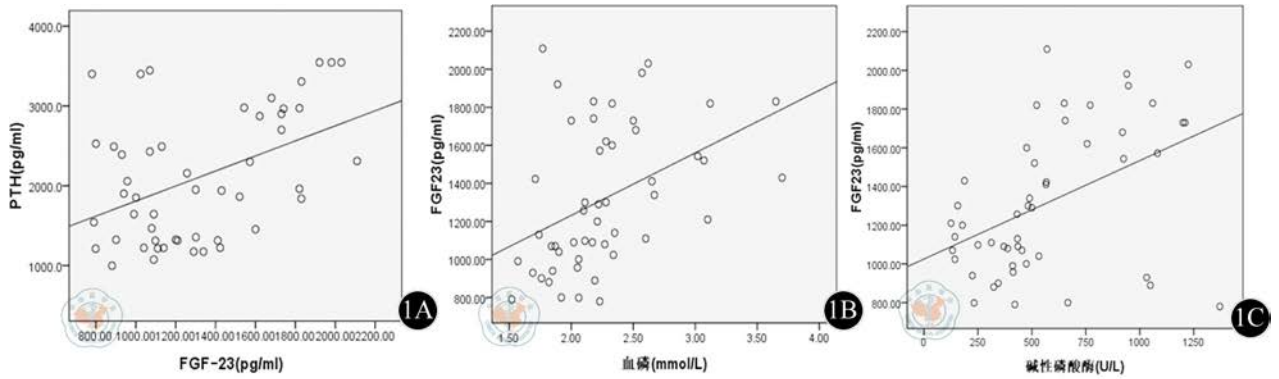


图1 SHPT组FGF-23与PTH、血磷、碱性磷酸酶的关系。1A: FGF-23与PTH呈正相关 ( $r=0.438, P=0.001$ ) ; 1B: FGF-23与血磷呈正相关 ( $r=0.421, P=0.002$ ) ; 1C: FGF-23与碱性磷酸酶呈正相关 ( $r=0.452, P=0.001$ )

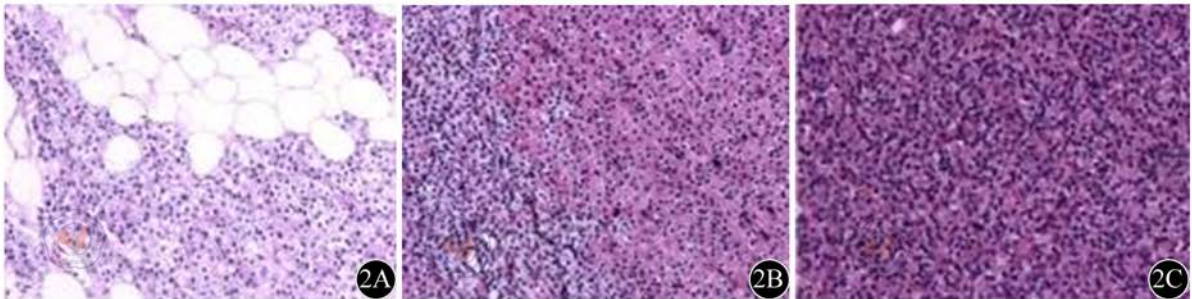


图2 各组甲状旁腺病理改变情况 (HE ×100)。2A: 对照组; 2B: 弥漫性增生组; 2C: 腺瘤性增生组

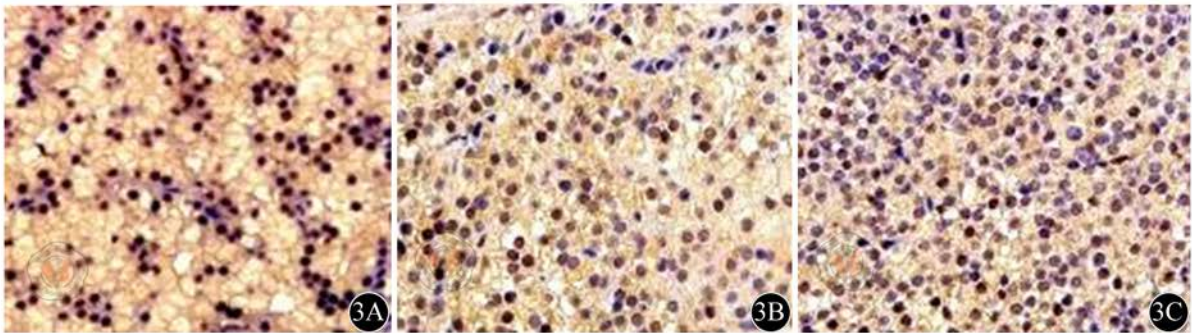


图3 各组ERK1/2表达情况 (免疫组化 ×400)。3A: 对照组; 3B: 弥漫性增生组; 3C: 腺瘤性增生组

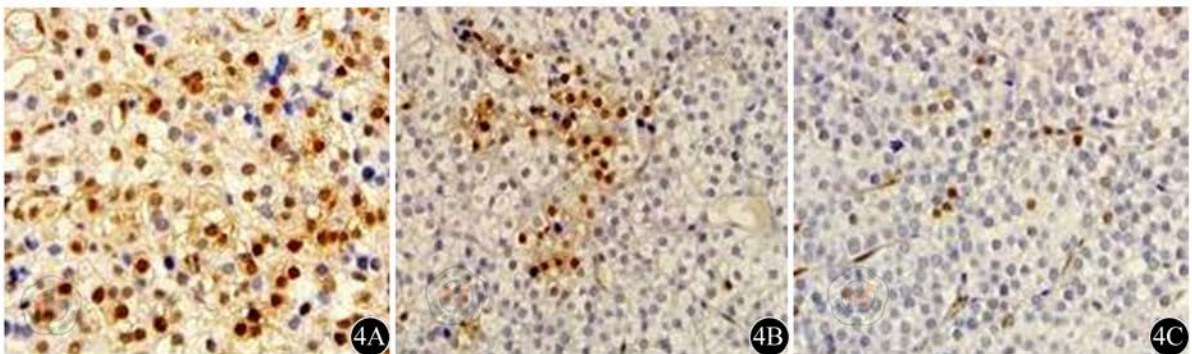


图4 各组p-ERK1/2表达情况 (免疫组化 ×400)。4A: 对照组; 4B: 弥漫性增生组; 4C: 腺瘤性增生组

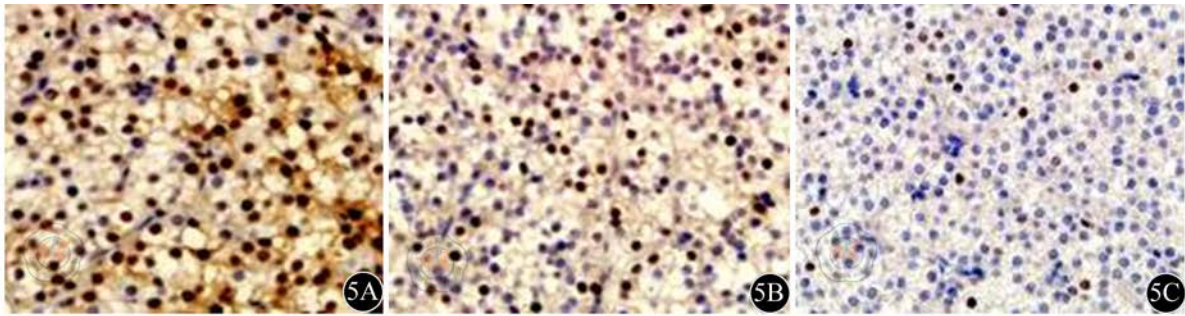


图5 各组Egr-1表达情况(免疫组化×400)。5A: 对照组; 5B: 弥漫性增生组; 5C: 腺瘤性增生组

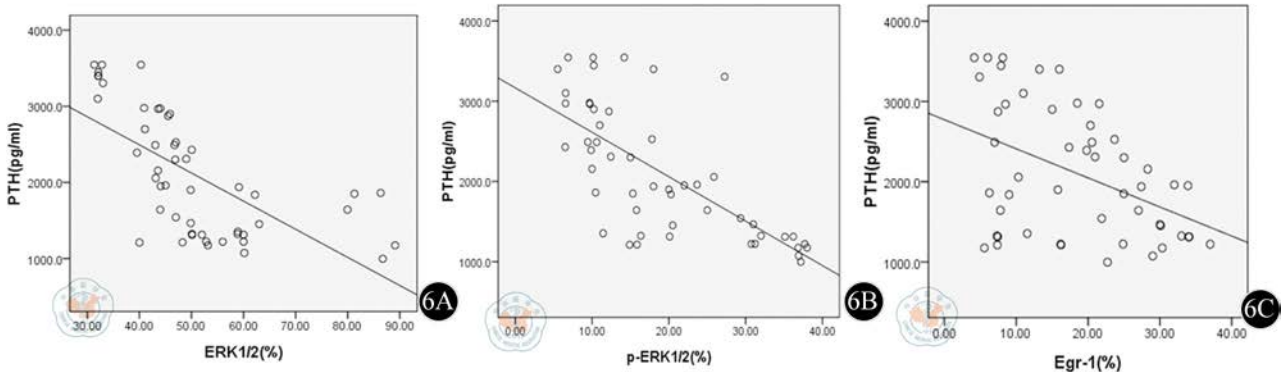


图6 SHPT组血PTH与甲状旁腺组织中相关蛋白表达的关系。6A: PTH与ERK1/2表达呈负相关 ( $r=-0.656, P=0.000$ ); 6B: PTH与p-ERK1/2表达呈负相关 ( $r=-0.696, P=0.000$ ); 6C: PTH与Egr-1表达呈负相关 ( $r=-0.439, P=0.001$ )

降,由此说明,FGF-23 主要经肾脏排泄<sup>[15]</sup>。本研究还显示,行甲状旁腺切除后 FGF-23 随着 PTH 水平的下降而下降,表明 PTH 对于维持 SHPT 患者血 FGF-23 水平起着一定的作用。同样在原发性甲状旁腺功能亢进的小鼠模型中,也发现甲状旁腺切除术可以纠正高水平 FGF-23<sup>[16]</sup>。

以上表明,FGF-23 调节 PTH 的途径中各环节发生障碍均可导致 SHPT 的发生,其中 ERK1/2 磷酸化途径的异常可能参与甲状旁腺细胞的增生及高 PTH 的分泌,在 SHPT 的发病中亦具有重要作用。但 SHPT 时 ERK1/2 磷酸化障碍的具体机制、FGF-23 和 ERK1/2 途径在导致 SHPT 中如何相互影响等问题还有待进一步深入研究。

### 参 考 文 献

[1] Moranne O, Froissart M, Rossert J, et al. Timing of onset of CKD-related metabolic complications. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20: 164-171.  
 [2] Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 2006, 444: 770-774.  
 [3] Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem*, 2006, 281: 6120-6123.  
 [4] 李柱宏, 李开龙. 成纤维生长因子 23 与慢性肾脏病关系的研究进展 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6: 2148-2150.  
 [5] 邵素荣, 张建荣. FGF-23 在继发性甲状旁腺功能亢进症发病机制中的作用进展. *中国血液净化*, 2012, 11: 392-395.  
 [6] Thompson N, Lyons J. Recent Progress in targeting the Raf/MEK/ERK pathway with inhibitors in cancer drug discovery. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5: 350-356.  
 [7] Suhasini M, Li H, Lohmann SM, et al. Cyclic-GMP-dependent protein

kinase inhibits the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Bio*, 1998, 8: 6983-6994.  
 [8] Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, et al. Blockade of the MAPkinase pathway suppresses growth of colon tumors *in vivo*. *Med*, 1999, 5: 810-816.  
 [9] Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinase. *Hypertension*, 1998, 31: 152-161.  
 [10] Zou Y, Hu Y, Metzler B, et al. Signal transduction in arteriosclerosis; mechanical stress-activated MAP kinase in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med*, 1998, 1: 827-834.  
 [11] Ben Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF-23 in rats. *J Clin Invest*, 2007, 117: 4003-4008.  
 [12] Roman-Garcia P, Carrillo-Lopez N, Naves-Diaz M, et al. Dual-specificity phosphatases are implicated in severe hyperplasia and lack of response to FGF-23 of uremic parathyroid glands from rats. *Endocrinology*, 2012, 153: 1627-1637.  
 [13] Sliem H, Tawfik G, Moustafa F, et al. Relationship of associated secondary hyperparathyroidism to serum fibroblast growth factor-23 in end stage renal disease: A case control study. *Indian J Endocr Metab*, 2011, 15: 105-109.  
 [14] Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, et al. Circulating concentration of FGF23 increase as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int*, 2003, 64: 2272-2279.  
 [15] Pande S, Ritter CS, Rothstein M, et al. FGF23 and sFRP-4 in chronic kidney disease and post-renal transplantation. *Nephrol Physiol*, 2006, 104: 23-32.  
 [16] Kawata T, Imanishi Y, Kobayashi K, et al. Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18: 2683-2688.

(收稿日期: 2013-07-23)

(本文编辑: 张志巍)

孙长丽, 张建荣. ERK1/2 磷酸化异常在慢性肾脏衰竭继发性甲状旁腺功能亢进发病机制中的作用 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (17):